

# تعیین بیوتیپ‌های بروسلا ملی‌تنسیس در ایزوله‌های انسانی و گوسفندی

ابوالفضل قلی‌پور\*، دکتر ابتهاج پیشوا\*\*، دکتر حسن تمیزی‌فر\*\*\*، دکتر منصور صالحی†، ندا سلیمانی††

## چکیده:

**زمینه و هدف:** بروسلوز یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. به دلیل اهمیت بیماری مذکور و تأثیر انواع بیوتیپ‌های باکتری بروسلا در طراحی استراتژی‌های کنترل بیماری، ایزوله‌های انسانی و گوسفندی بروسلا ملی‌تنسیس جهت تعیین بیوتیپ مورد بررسی قرار گرفتند.

**روش مطالعه:** در این بررسی ۵ ایزوله بروسلا ملی‌تنسیس کشت خون انسان و ۲۵ ایزوله کشت جنین گوسفند از بیمارستان‌ها و مراکز دامپزشکی اصفهان جمع‌آوری گردید. پس از استخراج DNA ژنومی باکتری‌های جدا شده با استفاده از SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)، پروتئیناز K و با روش فنل-کلروفرم و رسوب آن با اتانول، قطعات omp2a و omp2b هر کدام از ایزوله‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی omp2F و omp2R و با روش PCR، Amplify شدند و محصولات PCR (Polymerase Chain Reaction) با استفاده از آنزیمهای اندونوکلاز Taq I، Hinf I و Alu I برش داده و الکتروفورز و رنگ آمیزی شدند.

**نتایج:** قطعات omp2a و omp2b تمام ایزوله‌های انسانی و گوسفندی به ترتیب دارای اندازه‌هایی حدود ۱۱۰۰ bp (base pair) و ۱۲۰۰ bp و محصولات PCR در خصوص همه ایزوله‌های انسانی و گوسفندی اندازه‌ای مشابه، برای omp2a حدود ۱۱۰۰ bp و برای omp2b حدود ۱۲۰۰ bp بود. همچنین الگوی باندهای حاصل از PCR-RFLP تمام ایزوله‌ها مشابه الگوی باندهای بروسلا ملی‌تنسیس بیوتیپ یک بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به الگوی باندهای حاصل از PCR و PCR-RFLP قطعات omp2a و omp2b ایزوله‌های انسانی و گوسفندی می‌توان نتیجه گرفت که تمام نمونه‌های مورد مطالعه در منطقه اصفهان بیوتیپ یک بروسلا ملی‌تنسیس بوده و عامل بروسلوز انسانی و گوسفندی می‌باشند. این مطالعه بایستی مرتباً تکرار گردد تا از وارد شدن سویه‌ها و یا گونه‌های جدید بروسلا به منطقه آگاه شویم. این مسئله در کنترل بیماری بسیار حائز اهمیت است.

**واژه‌های کلیدی:** بروسلا، بروسلا ملی‌تنسیس، بیوتیپ، PCR-RFLP، PCR، omp2b، omp2a.

## مقدمه:

بررسی‌های متعدد از مناطق مختلف ایران حاکی از آن است که بیوتیپ یک بروسلا ملی‌تنسیس بیوتیپ بومی ایران است و بیوتیپ دو به نسبت کمتر و بیوتیپ سه به صورت نادر وجود دارد. هر سه بیوتیپ عامل بروسلوز بوده و از انسان و دام جدا شده‌اند (۴، ۲۰).

بروسلوز یا تب مالت ناشی از *Brucella melitensis* یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است و در بسیاری از مناطق ایران مخصوصاً در نواحی روستایی که محصولات لبنی پاستوریزه نشده مصرف می‌شود شایع است (۳).

در استان اصفهان برای اولین بار حدود ۵۰ سال قبل عامل بیماری بروسلوز، بروسلا ملی تنسیس، مورد شناسایی قرار گرفت که از خون مبتلایان به تب مالت جدا شد. حدود ۲۰ سال قبل نیز انستیتو رازی عامل شایع بروسلوز در این استان را با استفاده از تستهای بیوشیمیایی، اگلوتیناسیون با آنتی سرمهای اختصاصی M و A و فاز تایپینگ بروسلا ملی تنسیس بیوتیپ یک معرفی نمود (۵،۱).

بروسلا به عنوان عامل بیماری بروسلوز شامل تعدادی از گونه ها و بیوتیپ ها می باشد که در بسیاری از فاکتورها با هم تفاوت داشته و این امر می تواند روی مسائل اپیدمیولوژیک، بیمارزایی و در نهایت کنترل و پیشگیری بیماری مذکور تأثیر بگذارد. از نظر اپیدمیولوژی بروسلوز، شناخت بیوتیپ های مختلف باکتری بروسلا از اهمیت خاصی برخوردار بوده (۲) و به ویژه در ارتباط با نقل و انتقال حیوانات و فرآورده های دامی از منطقه ای به منطقه دیگر و یا مسافرت افراد به نقاط دیگر و انتقال آلودگی از آن نواحی، شناسایی سویه های موجود در ناحیه در هر زمان ارزش زیادی داشته و به عبارت دیگر نشان خواهد داد که آلودگی منطقه ای بوده یا از ناحیه

دیگری وارد شده است. از این رو تعیین تیپ سویه های مختلف از اهم وظایف مراکز کنترل بروسلوز بوده و بایستی به طور مداوم انجام پذیرد (۴،۲). گرچه تقسیم بندی معمول گونه های جنس بروسلا بر اساس تفاوت در پاتوژنسیته و نوع میزبان بوده و تمایز بین گونه ها و بیوتیپ های بروسلا عمدتاً بر اساس خصوصیات فنوتیپی آنتی ژنهای Lps، حساسیت به رنگها، نیاز به  $CO_2$ ، تولید  $H_2S$ ، ویژگی های متابولیک و فاز تایپینگ انجام می شود ولی این روشها بسیار دشوار بوده و از حساسیت بالایی برخوردار نمی باشند (۱۹،۱۸،۹) و از طرفی با توجه به این که هومولوژی DNA در جنس بروسلا برای تمام گونه ها بیش از ۹۰ درصد بوده، بنابراین در حال حاضر عمدتاً

سعی بر این است که برای شناسایی دقیق گونه ها و بیوتیپ های بروسلا از مطالعه به روش PCR استفاده شود (۱۵،۸،۷). کلونینگ و تعیین توالی تعدادی از ژنهای گونه های بروسلا عمدتاً به منظور توصیف آنتی ژنهای پروتئینی که می توانند برای واکسیناسیون و اهداف تشخیصی استفاده شوند، انجام گرفته است. از این رو اغلب ژنهای شناخته شده بروسلا در آغاز برای رسیدن به اهداف مذکور مورد مطالعه قرار گرفته اند ولی برخی از آنها خصوصاً آنهایی که پروتئین های غشای خارجی (outer membrane protein) را کد می کنند برای تایپینگ ملکولی گونه های بروسلا و برخی بیوتیپ های آنها مورد توجه قرار گرفته اند (۱۹،۱۶،۹،۶).

پورین، ۳۶ KDa توسط لوکوس omp2 کد می شود که این لوکوس از دو ژن بسیار نزدیک به هم به نامهای omp2a و omp2b تشکیل شده است. ژن omp2a دارای اندازه ای حدود ۱۰۹۵ bp و ژن omp2b دارای اندازه ای حدود ۱۲۳۵ bp می باشد. پس از هضم آنزیمی (Restriction Fragment Length Polymorphism)

omp2bF و 5'-ATCGATTCTCCACGCTTTTCGT-3' (پرایم-رفت) با-ترادف omp2bR و 5'-CCTTCAGCCAAATCAGAATG-3' (پرایم-برگشت) با-ترادف 5'-GGTCAGCATAAAAAGCAAGC-3' که توسط Axel و Verger در سال ۱۹۹۵ طراحی شده‌اند، انجام گرفت (۹).

جهت Amplify نمودن قطعات مورد نظر در حجم ۵۰ میکرولیتر، بافر PCR 10 x (حاوی  $MgCl_2$ )، mixed dNTPs (تهیه شده از شرکت Roche آلمان) ۰/۲ میلی‌مولار، پرایمرهای omp2R و omp2F (تهیه شده از شرکت Tib Molbiol آلمان) ۱ میکرومولار از هر کدام، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز ۱ واحد و نمونه DNA ۲۰۰-۷۵ نانوگرم استفاده شد و پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر Mineral oil استریل، نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (ساخت کارخانه Hybaid انگلستان) با پروفیل حرارتی زیر قرار داده شد:

مرحله denaturation ابتدایی ( $95^{\circ}C$ ) به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، مرحله denaturation ( $95^{\circ}C$ ) به مدت ۱ دقیقه، مرحله annealing ( $58^{\circ}C$ ) به مدت ۲ دقیقه، مرحله extension ( $70^{\circ}C$ ) به مدت ۳ دقیقه، مراحل ۴-۲، ۳۰ سیکل تکرار شد. مرحله extension نهایی ( $70^{\circ}C$ ) به مدت ۱۰ دقیقه).

محصول PCR توسط ژل آگارز (تهیه شده از شرکت Roche آلمان) ۱/۵ درصدی و با استفاده از TBE ۰/۵X الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تصویر الگوی باندها توسط دستگاه Black and white photo-print (ساخت شرکت Vilber Lourmat فرانسه) مشاهده و روی دیسکت ذخیره می‌شد.

به منظور هضم اندونوکلازی محصول PCR نمونه‌ها و بررسی RFLP آنها از آنزیم‌های Hinf I، Alu I

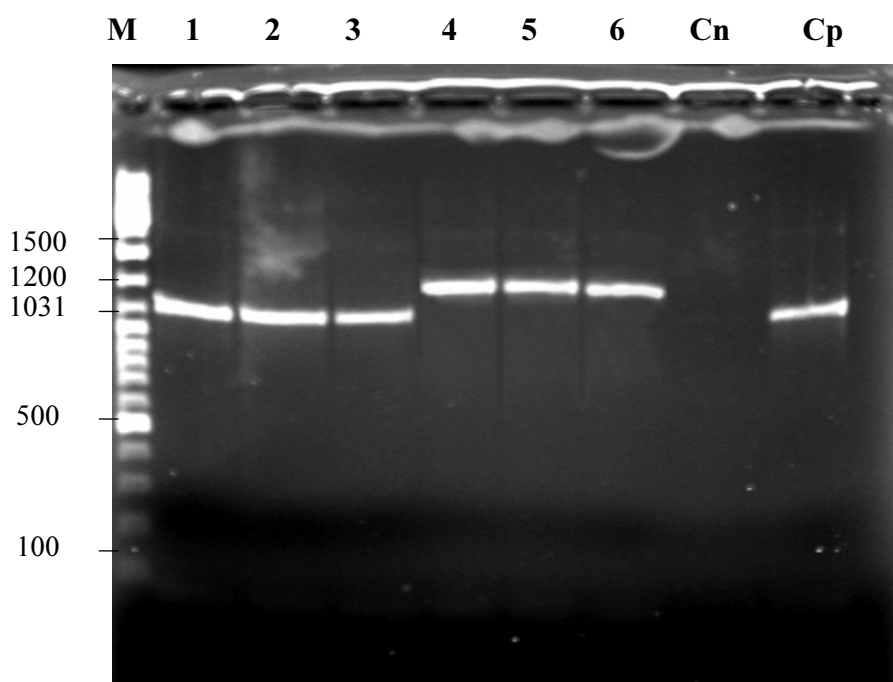
تفاوت‌های توالی بین هر دو نسخه ژن سبب به وجود آمدن طرح‌های متفاوت در الکتروفورز می‌شود که از روی این طرح‌ها می‌توان گونه و یا بیوتیپ‌های بروسلا را مورد شناسایی قرار داد (۱۹، ۱۷، ۱۱، ۹).

در این مطالعه قطعات omp2a و omp2b به تعداد ۳۰ ایزوله بروسلا ملی تنسیس انسانی و گوسفندی از منطقه اصفهان جمع‌آوری شده و مطالعه به روش PCR-RFLP انجام گرفت و هدف از این بررسی تعیین بیوتیپ‌های بروسلا ملی تنسیس در نمونه‌های مورد مطالعه بود.

## مواد و روشها:

با توجه به امکانات تعداد ۱۰۰ نمونه کشت خون از بیماران دارای علائم بروسلوز و تیترا-رایت بالای ۸/۱ در بیمارستانهای مختلف اصفهان و تعداد ۱۵۰ نمونه کشت جنین‌های سقط شده گوسفندان در مراکز دامپزشکی اصفهان انجام شد و نهایتاً ۵ نمونه باکتری بروسلا ملی تنسیس از انسان و ۲۵ نمونه باکتری بروسلا ملی تنسیس از جنین‌های سقط شده جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل شدند. استخراج DNA ژنومی از باکتری بروسلا ملی تنسیس در بخش بیولوژی ملکولی دانشگاه با استفاده از SDS، پروتئیناز K و با روش فنل-کلروفرم انجام و DNA توسط اتانول رسوب داده شد (۹). رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، محلول و در  $20^{\circ}C$ - نگهداری شد و پس از بررسی کمی و کیفی DNA استخراجی با اسپکتروفتومتر و الکتروفورز، تکثیر قطعات omp2a و omp2b با استفاده از پرایمرهای omp2aF (پرایم-رفت) با-ترادف omp2aR و 5'-GGCTATTCAAAATTCTGG-3' (پرایم-برگشت) با-ترادف





**تصویر شماره ۱:** مقایسه الگوی محصولات PCR قطعات omp2a و omp2b ایزوله‌های بروسلا ملی تنسیس انسانی و گوسفندی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. شماره‌های ۱ و ۲ و ۳ مربوط به قطعه omp2a (شماره ۱ مربوط به ایزوله‌های انسانی و شماره‌های ۲ و ۳ مربوط به ایزوله‌های گوسفندی)، شماره‌های ۴ و ۵ و ۶ مربوط به قطعه omp2b (شماره ۴ مربوط به ایزوله‌های انسانی و شماره‌های ۵ و ۶ مربوط به ایزوله‌های گوسفندی)، Cn مربوط به کنترل منفی، Cp مربوط به کنترل مثبت M مربوط به نشانگر (100-1500bp).

شده بررسی و تصاویر ژل‌ها روی دیسکت ذخیره می‌شد.

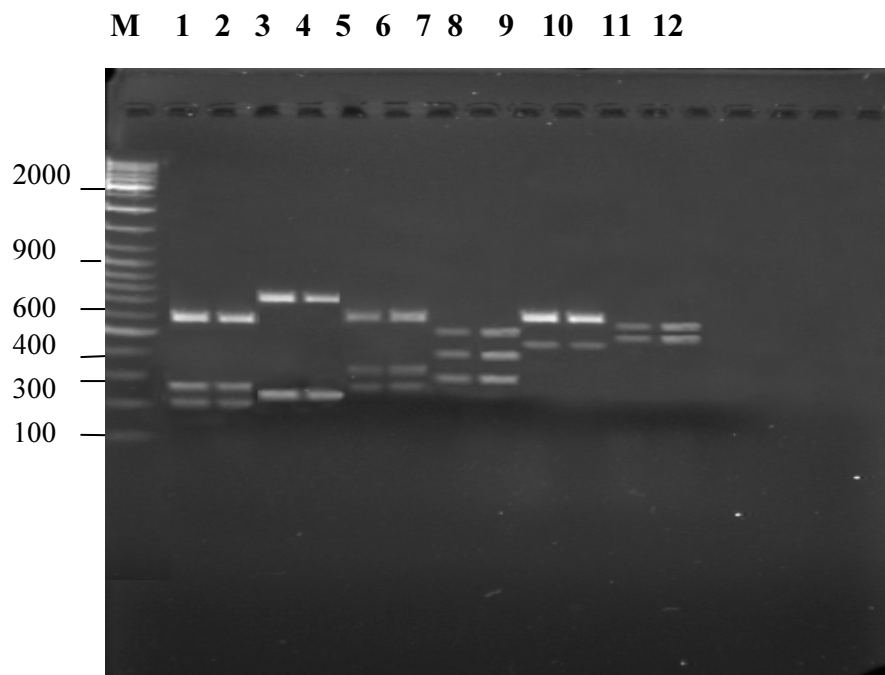
### نتایج:

DNA ژنومی باکتریهای بروسلا ملی تنسیس مربوط به ۵ ایزوله کشت خون انسان و ۲۵ ایزوله کشت جنین گوسفند پس از استخراج و تخلیص، به وسیله اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ارزیابی شدند. میزان غلظت DNA استخراجی ایزوله‌ها از ۳۰-۴۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و درجه خلوص (OD<sub>280</sub> / OD<sub>260</sub>) آنها از ۱/۳۷-۱/۹۸ و نتایج الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد از عدم مشاهده باند واضح تا باند بسیار مشخص متغیر بود.

و Taq I استفاده شد. هضم آنزیمی هر نمونه در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام می‌شد که از این حجم ۲ میکرولیتر مربوط به بافر مناسب آنزیم، ۵ میکرولیتر محصول PCR و ۱ میکرولیتر (۱۰ واحد) آنزیم مربوطه بود که با آب مقطر دیونیزه استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده می‌شد.

سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۳ ساعت در بن ماری با دمای مخصوص هر آنزیم انکوبه می‌شدند، که این دما طبق پیشنهاد کارخانه سازنده (Fermentas) در مورد آنزیمهای Alu I و Hinf I، ۳۷°C و در مورد Taq I ۶۵°C لحاظ می‌شد. سپس نمونه‌های RFLP شده الکتروفورز و الگوهای ایجاد





**تصویر شماره ۲:** مقایسه الگوی PCR-RFLP قطعات omp2a و omp2b ایزوله‌های بروسلا ملی تنسیس انسانی و گوسفندی با آنزیم‌های Alu I و Hinf I و Taq I روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. شماره‌های ۱ و ۲ و ۵ و ۶ و ۹ و ۱۰ مربوط به قطعه omp2a و شماره‌های ۳ و ۴ و ۷ و ۸ و ۱۱ و ۱۲ مربوط به قطعه omp2b، شماره‌های ۱ و ۳ مربوط به ایزوله‌های انسانی با آنزیم Alu I، شماره‌های ۲ و ۴ مربوط به ایزوله‌های گوسفندی با آنزیم Alu I، شماره‌های ۵ و ۷ مربوط به ایزوله‌های انسانی با آنزیم Hinf I، شماره‌های ۶ و ۸ مربوط به ایزوله‌های گوسفندی با آنزیم Hinf I، شماره‌های ۹ و ۱۱ مربوط به ایزوله‌های انسانی با آنزیم Taq I، شماره‌های ۱۰ و ۱۲ مربوط به ایزوله‌های گوسفندی با آنزیم Taq I، M مربوط به نشانگر (۱۰۰-۲۰۰۰bp).

پرایمرهای omp2aF (پرایمر رفت) و omp2aR (پرایمر برگشت) با PCR تکثیر و محصولات حاصله روی ژل آگارز ۱/۵ درصدی الکتروفورز شدند. این عمل در خصوص ژن omp2b نیز با پرایمرهای omp2bF و omp2bR انجام گردید. قطعات تکثیر شده omp2a و omp2b در تمام ایزوله‌های انسانی و گوسفندی، اندازه‌ای مشابه، برای omp2a حدود ۱۱۰۰ bp و برای omp2b حدود ۱۲۰۰ bp بود و هیچ اختلافی بین باندهای ایجاد شده مشاهده نگردید. تصویر شماره ۱ نتیجه مقایسه الکتروفورز قطعات حاصل از تکثیر omp2a و omp2b در ایزوله‌های انسانی و گوسفندی را نشان می‌دهد.

با توجه به غلظت و درجه خلوص و نتایج الکتروفورز آنها روی ژل آگارز، مناسب بودن DNA استخراجی برای انجام PCR ارزیابی می‌شد. اکثر ایزوله‌هایی که غلظت آنها کمتر از ۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و درجه خلوص آنها پایین‌تر از ۱/۶ بود، در روی ژل الکتروفورز باندهای قابل مشاهده‌ای تشکیل نمی‌دادند و برای انجام PCR، مناسب نبودند. در هر صورت ایزوله‌هایی که DNA استخراجی آنها با PCR Amplify نمی‌شد، از رده خارج و عمل استخراج روی ایزوله‌های مذکور دوباره انجام می‌گرفت. در نهایت DNA استخراجی از ایزوله‌های انسانی و گوسفندی پس از ارزیابی و تأیید با استفاده از

سپس محصول PCR ایزوله ها با آنزیم های اندونوکلاز Alu I، Hinf I و Taq I با تغییر در مدت زمان هضم، میزان آنزیم و سایر شرایط بهینه سازی گردید. در تمام ایزوله های انسانی و گوسفندی الگوهای ایجاد شده تقریباً یکسان و شبیه هم بودند و هیچ گونه تفاوتی بین الگوهای ایجاد شده توسط هر یک از آنزیم ها مشاهده نگردید. تصویر شماره ۲، نتیجه مقایسه الکتروفورز الگوهای ایجاد شده در هضم محصولات PCR قطعات omp2a و omp2b با آنزیم های Alu I، Hinf I و Taq I در ایزوله های انسانی و گوسفندی را نشان می دهد.

### بحث:

به منظور اهداف تشخیصی و اپیدمیولوژیکی، گونه ها و بیوتیپ های بروسلا را باید از یکدیگر تمیز داد. از این رو تحقیقات فعلی راجع به تقسیم بندی و شناسایی گونه ها و بیوتیپ های بروسلا عمدتاً بر اساس استفاده از روشهای تایپینگ ملکولی، از جمله روش PCR-RFLP متمرکز گشته اند، که این روشها به دلیل تماس کمتر با باکتری بروسلائی زنده نسبت به روش های مرسوم کشت و توصیف فنوتیپی از ایمنی (safety) بیشتری برخوردار می باشند. در این تحقیق قطعات omp2a و omp2b ایزوله های انسانی و گوسفندی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی omp2F و omp2R توسط PCR تکثیر شدند. الگوی باندهای ایجاد شده قطعه omp2a پس از الکتروفورز در همه ایزوله های انسانی و گوسفندی یکسان و شبیه به هم و اندازه ای حدود ۱۱۰۰ bp داشت، که با یافته های Axel و همکاران در سالهای ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ مشابه است. این محققین اندازه قطعه omp2a تکثیر یافته با روش PCR برای ایزوله های انسانی و گوسفندی را ۱۰۹۵ bp گزارش کردند (۹، ۱۰). الگوی باندهای ایجاد

شده قطعه omp2b نیز پس از الکتروفورز در همه ایزوله های انسانی و گوسفندی یکسان و شبیه هم و اندازه ای حدود ۱۲۰۰ bp داشت، که با یافته های Axel و همکاران در سالهای ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ همخوانی دارد. این محققین اندازه قطعه omp2b تکثیر یافته با روش PCR برای ایزوله های انسانی و گوسفندی را ۱۲۳۵ bp گزارش کردند (۹، ۱۰).

بنابراین با توجه به نتایجی که از باندهای حاصل از محصولات PCR قطعات omp2a و omp2b ایزوله های انسانی و گوسفندی حاصل شد، مشخص گردید که تمام ایزوله های بررسی شده بروسلا ملی تنسیس بودند. محصولات PCR قطعات omp2a و omp2b ایزوله های انسانی و گوسفندی توسط آنزیم های اندونوکلاز Alu I، Hinf I و Taq I برش داده شد و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق الگوی RFLP محصول PCR هر یک از دو قطعه omp2a و omp2b همه ایزوله های انسانی و گوسفندی پس از هضم آنزیمی با Alu I یکسان می باشد که با الگوی PCR-RFLP ایزوله های انسانی و گوسفندی هضم شده با آنزیم Alu I (با بیوتیپ یک) حاصل از بررسی های Ficht و همکاران در سال های ۱۹۹۰ و ۱۹۹۶ مشابه بودند (۱۲، ۱۳).

Axel و همکاران نیز در تحقیق دیگری در سال ۱۹۹۵، روی ایزوله های انسانی و گوسفندی جدا شده از مناطق جغرافیایی مختلف مثل فرانسه، اسرائیل، مکزیک، آمریکا، ترکیه و اسپانیا بررسی کرده و الگوی PCR-RFLP ایزوله های مذکور هضم شده با آنزیم Alu I (با بیوتیپ یک) را مشابه هم گزارش کردند که با بررسی حاضر مطابقت دارد (۹).

الگوی RFLP محصول PCR هر یک از دو قطعه omp2a و omp2b ایزوله های انسانی و گوسفندی



نتیجه گرفت که احتمالاً بیوتیپ یک بروسلا ملی تنسیس بیوتیپ شایع منطقه بوده و عامل بروسلوز انسانی و گوسفندی می باشد. این مطالعه هم اکنون نیز در سطح وسیعتری در حال انجام می باشد تا بتوان توسط روش PCR-RFLP گونه و بیوتیپ های شایع بروسلا را در منطقه شناسایی نمود. از آنجایی که شناخت بیوتیپ های مختلف باکتری بروسلا از اهمیت خاصی برخوردار می باشد، نظیر این مطالعه باید مرتباً تکرار شود تا از وارد شدن گونه ها یا بیوتیپ های جدید بروسلا از مناطق یا کشورهای همجوار به منطقه آگاه شویم. این مسأله در کنترل بیماری حائز اهمیت است و در مشخص نمودن نوع آلودگی منطقه (ناحیه ای یا غیر ناحیه ای) کمک می کند و با پی بردن به نوع آلودگی منطقه باید راهکارهایی جداگانه در نظر گرفته شود تا نهایتاً به کنترل بیماری پرهزینه و جبرانناپذیر بروسلوز منجر گردد.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کلیه کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند تشکر می نمایم.

پس از هضم با آنزیم Hinf I یکسان و شبیه هم بودند که با الگوی PCR-RFLP ایزوله های انسانی و گوسفندی هضم شده با آنزیم Hinf I (با بیوتیپ یک) به دست آمده از تحقیقات Herman و همکاران در سال ۱۹۹۲، Ficht و همکاران در سال های ۱۹۹۰ و ۱۹۹۶ مشابه می باشد (۱۲، ۱۳، ۱۴). الگوی RFLP محصول PCR هر یک از دو قطعه omp2a و omp2b همه ایزوله های انسانی و گوسفندی پس از هضم آنزیمی با Taq I یکسان می باشد که با الگوی PCR-RFLP ایزوله های انسانی و گوسفندی هضم شده با آنزیم Taq I (با بیوتیپ یک) حاصل از بررسی های Ficht و همکاران در سالهای ۱۹۹۰ و ۱۹۹۶ و Axel و همکاران در سال های ۱۹۹۵ مشابه می باشد (۹، ۱۲، ۱۳).

با توجه به الگوی PCR-RFLP قطعات omp2a و omp2b ایزوله های بروسلا ملی تنسیس انسانی و گوسفندی در اثر هضم آنزیمی با سه آنزیم اندونوکلاز Taq I، Hinf I، Alu I مشخص گردید که تمام نمونه های مورد مطالعه بیوتیپ یک بروسلا ملی تنسیس بوده و از طرفی بر اساس مطالعات قبلی انجام شده توسط روشهای بیوشیمیایی و اگلوتیناسیون با آنتی سرمهای اختصاصی در منطقه اصفهان می توان

### منابع:

۱. پزشکی یدا... . بروسلوزیس در اصفهان. مجموعه مقالات ارائه شده در اولین کنگره سراسری بروسلوز در ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۳۸-۲۹، ۱۳۷۱.
۲. ثمر گیتی. بروسلوز انسان و ویژگیهای آن در ایران، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳۰-۲۹، ۱۳۷۵.
۳. حاتمی حسین. اپیدمیولوژی بروسلوز، مجموعه مقالات ارائه شده در اولین کنگره سراسری بروسلوز در ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۲۶-۹، ۱۳۷۱.
۴. ذوقی اسماعیل. تعیین تیپ بروسلاها در ایران، مجموعه مقالات ارائه شده در اولین کنگره سراسری بروسلوز در ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۸-۳، ۱۳۷۱.

۵. ذوقی اسماعیل. میکروبیولوژی بروسلاها، انتشارات وزارت کشاورزی، ۵۲-۳۱، ۱۳۶۹.

6. Bardenstein S.; Mandelboim M.; Ficht TA.; Baum M.; et al. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the Pst I site polymorphism of Its omp2. Gene, 40: 1475-80, 2002.
7. Bricker BJ.; Ewalt DR.; MacMillan AP.; Foster G. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. J Clin Microbiol, 38: 1258-62, 2000.
8. Cloeckaert A.; Verger JM.; Grayon M.; Grepinet O. DNA polymorphism at the dnaK locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species specific marker. J Med Microbiol, 45(3): 200-5, 1996.
9. Cloeckaert A.; Verger JM.; Grayon M.; Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 KD and 36 KD outer membrane proteins of *Brucella*. Microbiology, 141: 2111-21, 1995.
10. Cloeckaert A.; Verger JM.; Grayon M.; Vizcaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. FEMS Microbiol, 145: 1-8, 1996.
11. Cloeckaert A.; Vizcaino N.; Paquet JY.; Bowden RA.; et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* SPP. Vet Microbiol, 90: 229-44, 2002.
12. Ficht TA.; Bearden S.; Marquis H. Genetic variation of the omp2 porin locus of the *Brucella*: species specific markers. Mol Microbiol, 1135-42, 1990.
13. Ficht TA.; Hussein HS.; Bearden S. Species specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. Int J Syst Bacteriol, 46: 329-31, 1996.
14. Herman L.; Riderr DE. Identification of *Brucella* SPP. by using the PCR. Appl Environ Microbiol, 58: 2099-101, 1992.
15. Sangari FT.; Aguero J. Identification of *Brucella abortus* S19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. Vaccine, 12: 435-8, 1994.
16. Tcherneva E.; Rijpens N.; Jersek B.; Herman LM. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. J Appl Microbiol, 88: 69-80, 2000.
17. Verger JM.; Grayon M.; GodFroid J.; Cloeckaert A. Classification of *Brucella* SPP. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. Microbes Infection, 3: 729-38, 2001.
18. Vizcaino N.; Cloeckaert A.; Verger JM.; Grayon M. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. Microbes Infection, 2: 1089-100, 2000.
19. Vizcaino N.; Verger JM.; Grayon M.; Cloeckaert A. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* SPP: evidence for a large deletion in *Brucella abortus* and other species specific markers. Microbiology, 143: 2913-21, 1997.
20. Zowghi E.; Ebadi A. Typing of *Brucella* strains isolated in Iran. Arch Inst Razi, 33: 109-14, 1982.

